

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
14 décembre 2000 (14.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/75336 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 15/37,
A61K 39/12, C07K 16/08, 14/025

(FR). FERRIES, Estelle [FR/FR]; 18, rue des Reculettes,
F-75013 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01513

(74) Mandataires: DEMACHY, Charles etc.; Grosset-Fournier & Demachy SARL, 20, rue de Maubeuge,
F-75009 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international: 31 mai 2000 (31.05.2000)

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/07012 3 juin 1999 (03.06.1999) FR

(84) États désignés (*regional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*):
BIOVECTOR THERAPEUTICS [FR/FR]; Chemin du
Chêne Vert, Boîte postale 169, F-31676 Labege Cedex
(FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE
LA RECHERCHE MEDICALE - INSERM [FR/FR];
101, rue de Tolbiac, F-75854 Paris Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): CHOPPIN,
Jeannine [FR/FR]; 45, rue Richard Gardebled, F-93110.
Rosny-sous-Bois (FR). BOURGAULT VILLADA, Isabelle
[FR/FR]; 4, rue Joseph Gramier, F-75007 Paris
(FR). GUILLET, Jean-Gérard [FR/FR]; 9 bis, rue Geoffroy Marie, F-75009 Paris (FR). CONNAN, Francine
[FR/FR]; 21, rue du Progrès, F-95170 Deuil-la-Barre

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: POLYPEPTOPIC PROTEINIC FRAGMENTS OF E6 AND E7 HPV PROTEINS, PRODUCTION AND USE THEREOF
IN VACCINES

A2 (54) Titre: FRAGMENT PROTEIQUE POLYPEPTOPIQUE DES PROTEINES E6 ET E7 DE HPV, LEUR OBTENTION ET
LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT EN VACCINATION

(57) Abstract: The invention relates to the use of polyepitopic fragments of a determined protein in the production of medicaments for preventing or treating pathologies in which said protein is recognized by the cellular immune system. Said fragments are chosen from E6 and E7 HPV proteins. The invention also relates to polyepitopic proteinic fragments of E6 and E7 HPV proteins, a method for the production and the use thereof in the field of vaccination.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet l'utilisation de fragments polyépitopiques d'une protéine déterminée pour la préparation de médicaments destinés à la prévention ou au traitement de pathologies dans lesquelles ladite protéine est reconnue par le système immunitaire cellulaire, ledits fragments polyépitopiques étant choisis parmi ceux des protéines E6 et E7 de HPV. L'invention a également pour objet des fragments protéiques polyépitopiques des protéines E6 et E7 de HPV, leur procédé d'obtention, et leurs utilisations, notamment dans le domaine de la vaccination.

WO 00/75336 A2

FRAGMENTS PROTEIQUES POLYEPITOPIQUES DES PROTEINES E6 ET E7 DE HPV, LEUR OBTENTION ET LEURS UTILISATIONS NOTAMMENT EN VACCINATION

5

La présente invention a pour objet des fragments protéiques polyépitopiques, tels que ceux des protéines E6 et E7 des papillomavirus humains, ou de la protéine p53 humaine, leur procédé d'obtention, et leurs utilisations, notamment dans le domaine de la vaccination thérapeutique ou préventive.

10

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de fragments polyépitopiques d'une protéine déterminée pour la préparation de médicaments destinés à la prévention ou au traitement de pathologies dans lesquelles ladite protéine est reconnue par le système immunitaire cellulaire.

15

Avantageusement, lesdits fragments polyépitopiques sont tels que leur acide aminé N-terminal correspond à l'acide aminé N-terminal de l'épitope situé en amont d'un ou plusieurs autres épitopes d'une région polyépitopique de ladite protéine, et leur acide aminé C-terminal correspond à l'acide aminé C-terminal de l'épitope situé en aval du ou des épitopes susmentionnés de ladite région polyépitopique.

20

Ainsi, les fragments protéiques polyépitopiques susmentionnés de la présente invention correspondent avantageusement aux régions polyépitopiques d'une protéine déterminée, à savoir aux régions contenant plusieurs épitopes reconnus par les cellules T en association avec les différentes molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), lesdites régions étant sélectionnées parmi celles ayant la caractéristique d'être dégradées *in vitro* en peptides plus courts par des protéasomes, tel que le protéasome 20S, lorsque le fragment protéique testé est mis en présence dudit protéasome, notamment selon la méthode détaillée suivante. Le fragment protéique (environ 75 µg lorsqu'il s'agit d'un polypeptide d'environ 30 acides aminés) est incubé à 37°C avec environ 15 µg de protéasome 20S (Calbiochem Ref 539150, La Jolla, CA, USA) dans 500 µl du tampon suivant : 20 mM Tris-HCl pH8, 0,5 mM EDTA. Des aliquots de 50 µl sont prélevés après des temps d'incubation de 24 et 48 heures, et sont analysés par chromatographie liquide haute pression (HPLC). Les produits de digestion des protéasomes sont séparés par RP-HPLC (Perkin Elmer) en utilisant une colonne C18 et un gradient acetonitrile (de 0 à 100 % contenant 0,1 % d'acide trifluoroacétique, en 90

mn, taux d'élution 0,8 ml/mn). Les produits de clivage sont détectés à 214 nm par un détecteur à absorption (759A, Applied Biosystems).

Avantageusement les régions polyépitopiques définies ci-dessus possèdent la caractéristique de contenir des acides aminés hydrophobes.

5 Les différents épitopes de la région polyépitopique de la protéine déterminée, et délimitant les fragments protéiques polyépitopiques, sont avantageusement sélectionnés parmi les peptides :

10 - se liant à une molécule déterminée du CMH, notamment à une molécule de type HLA déterminé, et ce jusqu'à des concentrations d'environ 10^{-6} M à environ 10^{-10} M en peptide pour des concentrations d'environ 10^{-7} M en molécule HLA, notamment dans les conditions décrites ci-après,

15 - et formant un complexe stable avec cette molécule du CMH, à savoir notamment un complexe dans lequel ledit peptide reste lié à ladite molécule pendant au moins environ 3 heures à 37°C.

15 A titre d'illustration, les épitopes susmentionnés de l'invention sont sélectionnés parmi les peptides susceptibles :

20 - d'une part de s'associer avec les molécules du CMH, notamment par mise en œuvre de la méthode suivante :

25 . incubation (notamment pendant environ 2 heures à 25°C, puis environ 15 heures à 4°C) du peptide en présence de molécules du CMH, provenant de la lyse de cellules humaines ou animales, ou purifiées notamment par chromatographie d'affinité à partir de lignées cellulaires humaines ou animales,

30 . piégeage des complexes formés lors de l'étape précédente sur un support solide recouvert d'un premier anticorps, notamment monoclonal, reconnaissant spécifiquement les molécules du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison audit peptide,

35 . addition sur le support solide précédent d'un deuxième anticorps marqué, notamment par couplage à un marqueur radioactif, enzymatique ou fluorescent, ledit anticorps marqué reconnaissant spécifiquement soit les chaînes lourdes du CMH dans leur conformation dépendante de leur liaison au peptide, soit la chaîne légère du CMH ou la β 2-microglobuline se liant spécifiquement aux différentes chaînes lourdes du CMH dans leur conformation susmentionnée,

détection, après rinçage du support solide, de l'éventuelle présence du deuxième anticorps marqué resté fixé sur le support solide, témoignant d'un effet d'association entre les molécules du CMH et le peptide étudié,

5 - et, d'autre part, de former un complexe avec lesdites molécules du CMH, dont la stabilité peut être évaluée par mise en œuvre d'une méthode de suivi dans le temps de la liaison établie entre le peptide et les molécules du CMH, cette méthode étant avantageusement effectuée selon un protocole identique à la méthode précédente, mais dans laquelle l'étape d'incubation du peptide en présence des molécules du CMH sur le support solide recouvert dudit premier anticorps, est précédée par une étape préalable 10 d'élimination du peptide libre susceptible d'être présent dans le milieu réactionnel, notamment par lavage du support solide, ladite étape d'incubation étant effectuée (avantageusement à une température de 37°C) pendant des temps variables de 1h, 3h, 5h, 24h et 48h.

15 Comme mentionné ci-dessus, les épitopes de l'invention doivent être reconnus par les cellules T en association avec les molécules du CMH et s'associer à ces dernières, notamment dans le cadre de la mise en œuvre du test de reconnaissance décrit ci-dessus. Cette association peut être faible (détectable à des concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} M), intermédiaire (détectable à des concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} M), ou forte (détectable à des 20 concentrations en analogues peptidiques de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} M). Les peptides associés aux molécules du CMH dans le cadre de la présente invention sont de préférence susceptibles de se lier pendant au moins environ 3 heures auxdites molécules du CMH.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet les épitopes (encore désignés peptides ci-dessus et ci-après) tels que décrits ci-dessus et caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés parmi ceux susceptibles :

- d'induire *in vitro* la cytolysé par des lymphocytes T cytotoxiques, de cellules cibles présentant à leur surface le peptide susmentionné associé aux molécules du CMH, lesdits lymphocytes T cytotoxiques étant avantageusement prélevés sur un patient atteint d'une pathologie dans laquelle est impliqué le peptide étudié,
- et d'induire *in vitro* la sécrétion de cytokines (ou interleukines) par les lymphocytes T cytotoxiques susmentionnés, notamment IL-2, IL-4 ou l'interféron γ .

5

Le cas échéant, les épitopes susmentionnés sont choisis parmi ceux capables d'induire *in vitro* l'apparition et la croissance de lymphocytes T cytotoxiques à partir de cellules humaines ou animales, notamment à partir de cellules mononucléées issues du sang périphérique (PBMC), en présence de facteurs nécessaires à la croissance et la différenciation des cellules T cytotoxiques.

10

Les fragments protéiques polyépitopiques de l'invention sont davantage caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles de contenir des épitopes CD4 reconnus par les cellules T auxiliaires en association avec les molécules du CMH de classe II, cette propriété favorisant l'induction et le maintien des cellules T CD8⁺ reconnaissant les épitopes compris dans lesdits fragments.

15

La présente invention est illustrée à l'aide des figures 1 et 2 représentant respectivement les séquences peptidiques de la protéine E6 et E7 de la souche 16 des papillomavirus humains (HPV 16), ainsi que les fragments polyépitopiques de l'invention, et les épitopes au sein de ces fragments.

20

L'invention a plus particulièrement pour objet les fragments polyépitopiques de la protéine E6 ou E7 d'HPV, et plus particulièrement ceux de la protéine E6 représentée sur la figure 1, ou par SEQ ID NO : 2, ou de la protéine E7, représentée sur la figure 2, ou par SEQ ID NO : 11, de HPV 16, caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence peptidique d'environ 15 à environ 30 acides aminés, cette séquence peptidique contenant les séquences en acides aminés d'au moins 3 épitopes différents, et de préférence d'au moins 4 épitopes différents se liant de façon stable à des molécules HLA de type identique ou différent, lorsque ces épitopes sont obtenus par dégradation enzymatique de ladite séquence peptidique, notamment dans le protéasome, de sorte qu'au moins 4 molécules HLA de différents types, et de préférence au moins 5 molécules HLA de différents types, se lient à ces épitopes, ces 4 ou 5 molécules HLA étant choisies parmi celles de type A1, A2, A3, A11, A24, A29, B7, B8, B18, B27, B35, B44, B51, et B62.

25

Avantageusement, les fragments polyépitopiques selon l'invention sont tels que le nombre d'acides aminés de leur séquence peptidique est supérieur ou égal à 17, et inférieur ou égal à 30.

30

L'invention concerne plus particulièrement les fragments polyépitopiques de la protéine E6 de HPV définis ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence peptidique d'environ 15 à 30 acides aminés, cette séquence peptidique contenant les séquences en acides aminés d'au moins 5 épitopes différents, et de

préférence d'au moins 6 épitopes différents se liant de façon stable à des molécules HLA de type identique ou différent, lorsque ces épitopes sont obtenus par dégradation enzymatique de ladite séquence peptidique, notamment dans le protéasome, de sorte qu'au moins 6 molécules HLA de différents types, et de préférence au moins 7 molécules HLA de différents types se lient à ces épitopes, ces 6 ou 7 molécules HLA étant choisies parmi celles de type A1, A2, A3, A11, A24, A29, B7, B8, B18, B27, B35, B44, et B51.

Avantageusement, les fragments polyépitopiques de la protéine E6 selon l'invention, sont tels que le nombre d'acides aminés de leur séquence peptidique est supérieur ou égal à 20 (de préférence supérieur ou égal à 22), et inférieur ou égal à 30.

Avantageusement encore, les fragments polyépitopiques susmentionnés de la protéine E6 de HPV, sont caractérisés en ce qu'ils comprennent tous un épitope se liant à la molécule HLA de type B35, un épitope se liant à la molécule HLA de type B44, et un épitope se liant à la molécule HLA de type B51.

L'invention a plus particulièrement pour objet, le fragment polyépitopique de la protéine E6 de HPV tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 30 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 15 et 44 de la séquence peptidique de la protéine E6 de HPV, et caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 4 suivante :

(15)RPRKLPQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQL(44)

ledit fragment contenant 9 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 8 molécules HLA de types suivants : A2, A11, A29, B7, B8, B35, B44, ou B51, lesdits épitopes étant les suivants :

- (15)RPRKLPQL(22) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, ou B35,
- (18)KLPQLCTEL(26) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (19)LPQLCTEL(26) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B51,
- (21)QLCTELQTTI(30) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (24)TELQTTIHD(33) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- (29)TIHDIILRCV(38) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (33)IILECVYCK(41) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A11,
- (35)LECVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- (37)CVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8.

L'invention concerne également le fragment polyépitopique de la protéine E6 de HPV tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 17

acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 46 et 62, ou au fragment de 22 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 46 et 67 de la séquence peptidique de la protéine E6 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 6 suivante :

5 (46)RREVYDFAFRDLCIVYRDGNPY(67)

ledit fragment contenant 6 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 10 molécules HLA de types suivants : A2, A3, A11, A24, A29, B7, B27, B35, B44, ou B51, lesdits épitopes étant les suivants :

- (46)RREVYDFAFR(55) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- 10 - (49)VYDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (50)YDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- (52)FAFRDLCIV(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, B35, B51, ou B7,
- (54)FRDLCIVYR(62) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, ou A11,
- 15 - (59)IVYRDGNPY(67) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, ou A11.

L'invention a également pour objet le fragment polyépitopique de la protéine E6 de HPV tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 29 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 80 et 108 de la séquence peptidique de la protéine E6 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par 20 la séquence peptidique SEQ ID NO : 8 suivante :

(80)ISEYRHHCYSLYGTTLLEQQYNKPLCDLLI(108)

ledit fragment contenant 6 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 10 molécules HLA de types suivants : A1, A3, A11, A24, A29, B7, B18, B35, B44, ou B51, lesdits épitopes étant les suivants :

- 25 - (80)ISEYRHHCY(88) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, ou B18,
- (81)SEYRHHCY(88) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- (87)CYSLYGTTL(95) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (94)TLEQQYNK(101) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, ou A11,
- (95)LEQQYNKPL(103) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou 30 B44,
- (101)KPLCDLLI(108) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, B35, ou B51.

L'invention a plus particulièrement pour objet le fragment polyépitopique de la protéine E6 de HPV tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au

fragment de 22 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 118 et 139 de la séquence peptidique de la protéine E6 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 10 suivante :

(118)CPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRW(139)

5 ledit fragment contenant 6 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 7 molécules HLA de types suivants : A24, B8, B18, B27, B35, B44, ou B51, lesdits épitopes étant les suivants :

- (118)CPEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8, B18, B35, B51,
- (119)PEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- 10 - (127)DKKQRFHNI(135) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8,
- (128)KKQRFHNIR(136) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (130)QRFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (131)RFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24.

15 L'invention concerne également les fragments polyépitopiques de la protéine E7 de HPV tels que définis ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence peptidique d'environ 15 à 30 acides aminés, cette séquence peptidique contenant les séquences en acides aminés d'au moins 3 épitopes différents, et de préférence d'au moins 4 épitopes différents se liant de façon stable à des molécules HLA de type identique ou différent, lorsque ces épitopes sont obtenus par dégradation enzymatique 20 de ladite séquence peptidique, notamment dans le protéasome, de sorte qu'au moins 4 molécules HLA de différents types, et de préférence au moins 5 molécules HLA de différents types se lient à ces épitopes, ces 4 ou 5 molécules HLA étant choisies parmi celles de type A1, A2, A3, A11, A29, B7, B18, B35, B44, et B62.

25 Avantageusement, les fragments polyépitopiques de la protéine E7 selon l'invention, sont tels que le nombre d'acides aminés de leur séquence peptidique est supérieur ou égal à 17, et inférieur ou égal à 23.

Avantageusement encore, les fragments polyépitopiques de la protéine E7 de HPV susmentionné, sont caractérisés en ce qu'ils comprennent tous un épitope se liant à la molécule HLA de type B44.

30 L'invention a plus particulièrement pour objet le fragment polyépitopique de la protéine E7 de HPV tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 23 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 3 et 25 de la séquence peptidique de la protéine E7 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 14 suivante :

(3)GDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCY(25)

ledit fragment contenant 5 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 6 molécules HLA de types suivants : A1, A2, B18, B35, B44, ou B62, lesdits épitopes étant les suivants :

- 5 - (3)GDTPTLHEY(11) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (5)TPTLHEYML(13) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (11)YMLDLQPETT(20) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (15)LQPETTDLY(23) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (16)QPETTDLYCY(25) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, ou B18.

10 L'invention concerne également le fragment polyépitopique de la protéine E7 de HPV tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 17 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 44 et 60 de la séquence peptidique de la protéine E7 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 16 suivante :

15 (44)QAEPDRAHYNIVTFCCCK(60)

ledit fragment contenant 4 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 6 molécules HLA de types suivants : A1, A3, A11, A29, B7, B18, B35, ou B44, lesdits épitopes étant les suivants :

- 20 - (44)QAEPDRAHY(52) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, ou B18,
- (45)AEPDRAHY(52) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- (46)EPDRAHYNIV(55) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, ou B35,
- (53)NIVTFCCCK(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, ou A11.

25 L'invention a également pour objet le fragment polyépitopique de la protéine E7 de HPV tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 19 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 79 et 97 de la séquence peptidique de la protéine E7 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 18 suivante :

(79)LEDLLMGTLGIVCPICSQK(97)

30 ledit fragment contenant 4 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 5 molécules HLA de types suivants : A2, A3, A11, A29, ou B44, lesdits épitopes étant les suivants :

- (79)LEDLLMGTL(87) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- (82)LLMGTLGIV(90) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (86)TLGIVCPI(93) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,

- (89)IVCPICSQK(97) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, ou A11.

L'invention a également pour objet les fragments polyépitopiques de la protéine p53 humaine caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence peptidique d'environ 20 à environ 35 acides aminés, cette dernière contenant les séquences en acides aminés d'au moins 3 épitopes différents se liant de façon stable à des molécules HLA de type identique ou différent, lorsque ces épitopes sont obtenus par dégradation enzymatique de ladite séquence peptidique, notamment dans le protéasome, de sorte qu'au moins 3 molécules HLA de différents types soient reconnues par lesdits épitopes et se lient à ces derniers, ces 3 molécules HLA étant choisies parmi celles de type A1, A2, A3, A24, B7, B8, B27, B35, B44, et B62.

10 L'invention concerne également les fragments polyépitopiques de la protéine p53 humaine susmentionnés, caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence peptidique d'environ 20 à environ 35 acides aminés, cette dernière contenant les séquences en acides aminés d'au moins 5 épitopes différents, et de préférence d'au moins 6 épitopes 15 différents se liant à des molécules HLA de type identique ou différent, de sorte qu'au moins 3 molécules HLA de différents types, et de préférence au moins 4 molécules HLA de différents types soient reconnues par lesdits épitopes et se lient à ces derniers, ces 3 ou 4 molécules HLA étant choisies parmi celles de type A2, A24, B27, B35, B44, et B62.

20 L'invention a plus particulièrement pour objet le fragment polyépitopique de la protéine p53 humaine tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 32 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 106 et 137 de la séquence peptidique de la protéine p53, ou au fragment de 36 acides aminés délimité par les acides aminés aux positions 102 et 137 de ladite séquence peptidique, 25 ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(102)TYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQL(137)

ledit fragment contenant 6 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 4 molécules HLA de types suivants : A2, A24, B35, ou B62, lesdits épitopes étant les suivants :

- 30 - (102)TYQGSYGFRL(111) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (105)GSYGFRLGFL(114) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (106)SYGFRLGFL(114) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (118)TAKSVTCTY(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (125)TYSPALNKM(134) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,

- (129)ALNKMFCQL(137) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35.

L'invention a également pour objet le fragment polyépitopique de la protéine p53 humaine tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 21 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 149 et 169 de la séquence peptidique de la protéine p53, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(149)STPPPGTRVRAMAIYKQSQHM(169)

ledit fragment contenant 6 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 6 molécules HLA de types suivants : A2, A3, A24, B27, B35, ou B62, lesdits épitopes étant les suivants :

- (149)STPPPGTRV(157) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (152)PPGTRVRAM(160) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (155)TRVRAMAIYK(164) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (156)RVARAMAIY(163) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (156)RVARAMAIYK(164) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3,
- (162)IYKQSQHM(169) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24.

L'invention concerne également le fragment polyépitopique de la protéine p53 humaine tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 26 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 187 et 212 de la séquence peptidique de la protéine p53, ou au fragment de 34 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 187 et 220 de ladite séquence peptidique, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(187)GLAPPQHLIRVEGNLRVEYLLDRNTFRHSVVVPY(220)

ledit fragment contenant 11 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 7 molécules HLA de types suivants : A1, A2, A24, B7, B8, B27, ou B44, lesdits épitopes étant les suivants :

- (187)GLAPPQHLIRV(197) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (189)APPQHLIRV(197) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7,
- (195)IRVEGNLRVEY(205) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (196)RVEGNLRVEY(205) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (197)VEGNLRVEY(205) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (201)LRVEYLDDR(209) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (203)VEYLLDDRNTF(212) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (204)EYLLDDRNTF(212) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,

- (210)NTFRHSVVV(218) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8,
- (211)TFRHSVVV(218) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (212)FRHSVVVPY(220) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27.

5 L'invention a également pour objet le fragment polyépitopique de la protéine p53 humaine tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 18 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 226 et 243 de la séquence peptidique de la protéine p53, et caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(226)GSDCTTIHYNYMCNSSCM(243)

10 ledit fragment contenant 3 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 3 molécules HLA de types suivants : A1, A24, ou B44, lesdits épitopes étant les suivants :

- (226)GSDCTTIHY(234) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1,
- (227)SDCTTIHYNY(236) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (235)NYMCNSSCM(243) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24.

15 L'invention concerne également le fragment polyépitopique de la protéine p53 humaine tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 25 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 249 et 273 de la séquence peptidique de la protéine p53, ou au fragment de 26 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 248 et 273 de ladite séquence peptidique, ou 20 au fragment de 33 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 248 et 280 de ladite séquence peptidique, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique suivante:

(248)RRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGR(280)

25 ledit fragment contenant 8 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 6 molécules HLA de types suivants : A2, B7, B27, B35, B44, ou B62, lesdits épitopes étant les suivants :

- (248)RRPILTIITL(257) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (249)RPILTIITL(257) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35 et B7,
- (255)ITLEDSSGN(263) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- 30 - (257)LEDSSGNLL(265) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (263)NLLGRNSF(270) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (264)LLGRNSFEV(272) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (266)GRNSFEVR(273) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (272)VRVCACPGR(280) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27.

L'invention concerne également les séquences peptidiques dérivées des fragments polyépitopiques susmentionnés de la protéine E6 ou E7, ou de la protéine p53, notamment ;

5 - par substitution, et/ou suppression, et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, des fragments susmentionnés, et/ou

- par modification d'au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique des fragments susmentionnés, notamment par introduction d'une liaison du type rétro, ou rétro-inverso, et/ou

10 - par substitution d'au moins un acide aminé de la chaîne peptidique de la séquence ou du fragment susmentionnés, par un acide aminé non protéinogénique,

lesdites séquences dérivées contenant des peptides ou pseudopeptides se liant spécifiquement à la ou aux mêmes molécules du CMH que celles se liant aux peptides contenus dans les fragments polyépitopiques susmentionnés dont elles dérivent.

15 Par séquence dérivée par introduction d'une liaison rétro-inverso, il faut entendre tout analogue peptidique d'un fragment susmentionné, ledit analogue étant constitué d'une chaîne peptidique dans laquelle l'un au moins des résidus d'une part est lié à au moins un résidu voisin par une liaison -NH-CO-, et d'autre part, est de chiralité opposée à celle de ce même résidu aminoacyle dans la chaîne peptidique du peptide parent (à savoir du fragment susmentionné dont elle dérive).

20 Par séquence dérivée par introduction d'une liaison rétro, il faut entendre tout analogue peptidique d'un fragment susmentionné, ledit analogue étant constitué d'une chaîne peptidique dans laquelle l'un au moins des résidus, est lié à au moins un résidu voisin par une liaison -NH-CO-, la chiralité de la totalité des résidus aminoacyles impliqués dans au moins une liaison -NH-CO- étant conservée par rapport aux résidus correspondant de la chaîne peptidique du peptide parent.

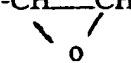
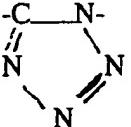
Il va de soi que les liaisons -CO-NH- et -NH-CO- doivent être prises en compte dans ce qui précède, dans le sens de la chaîne peptidique parente allant de l'extrémité aminotérminale (N-terminale) vers l'extrémité carboxyterminale (C-terminale).

30 Par "acide aminé protéinogénique", on entend, dans ce qui précède, tout acide aminé entrant dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel.

Par "acide aminé non protéinogénique", on entend par opposition à la définition précédente, tout acide aminé n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel. On entend plus particulièrement par "acide aminé non

"protéinogénique", tout acide aminé dont le carbone portant la chaîne latérale R, à savoir le groupe -CHR-, situé entre -CO- et -NH- dans la chaîne peptidique naturelle, est remplacé par un motif n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel.

5 L'invention a plus particulièrement pour objet les séquences dérivées telles que décrites ci-dessus, caractérisés en ce que l'une au moins des liaisons peptidiques -CO-NH- de la chaîne peptidique du peptide parent est remplacée par une liaison différente de la liaison -CO-NH-, ladite liaison différente étant notamment choisie parmi les suivantes :

10	-CH ₂ -NH-	(méthylène amino) ;
	-CH ₂ -CH ₂ -	(carba) ;
	-CO-CH ₂ -	(cétométhylène) ;
	-CH ₂ -O-	(méthylène-oxy) ;
	-CHOH-CH ₂ -	(hydroxyéthylène) ;
15	-CHOH-CHOH-	(di-hydroxyéthylène) ;
	-CH=CH-	(E ou Z oléfine) ;
	-CHCN-NH-	(cyanométhylène amino) ;
	-S-CH ₂ -	(thiométhylène) ;
	-CH ₂ -S-	(méthylène thio) ;
20	-CS-NH-	(thioamide) ;
	-PO ₂ -NH-	(phosphonamide) ;
	-CHOH-	(hydroxyméthylène) ;
	-NH-CO-NH-	(urée) ;
		(oxirane) ;
25		(tétrazole) ;
30	-CH ₂ -CO-NH-	(β-homologation) ;
	-CHOH-CH ₂ -NH-	(hydroxyéthylène amino) ;

-CO-NH-NH- (hydrazino).

L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques codant pour un fragment polyépitopique de la protéine E6 ou E7, ou pour une séquence peptidique dérivée, tels que définis ci-dessus, lesdites séquences nucléotidiques étant issues de la 5 séquence SEQ ID NO : 1 codant pour la protéine E6, ou de la séquence SEQ ID NO : 11 codant pour la protéine E7.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet les séquences nucléotidiques définies ci-dessus, choisies parmi les suivantes:

- la séquence SEQ ID NO : 3, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 4 susmentionné de la protéine E6,
- 10 - la séquence SEQ ID NO : 5, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 6 susmentionné de la protéine E6,
- la séquence SEQ ID NO : 7, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 8 susmentionné de la protéine E6,
- 15 - la séquence SEQ ID NO : 9, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 10 susmentionné de la protéine E6,
- la séquence SEQ ID NO : 13, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 14 susmentionné de la protéine E7,
- la séquence SEQ ID NO : 15, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 16 20 susmentionné de la protéine E7,
- la séquence SEQ ID NO : 17, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 18 susmentionné de la protéine E7.

L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques codant pour un fragment polyépitopique de la protéine p53, ou pour une séquence peptidique dérivée, 25 tels que définis ci-dessus.

L'invention a également pour objet tout vecteur, notamment plasmide, cosmide ou phage, contenant au moins une séquence nucléotidique susmentionnée placée sous le contrôle des éléments nécessaires à la transcription de ladite séquence, notamment sous le contrôle d'un promoteur et d'un terminateur de transcription.

30 L'invention concerne également les cellules hôtes, notamment bactéries, virus, levures, cellules eucaryotes, transformées à l'aide d'un vecteur susmentionné selon l'invention, de manière à intégrer de façon stable dans leur génome ou à maintenir de

manière stable dans leur cytoplasme, au moins une séquence nucléotidique selon l'invention.

L'invention concerne également tout vecteur comprenant un ou plusieurs fragments polyépitopiques et/ou une ou plusieurs séquences peptidiques dérivées tels que définis ci-dessus, ou tout vecteur comprenant une ou plusieurs séquences nucléotidiques susmentionnées, lesdits vecteurs étant choisis parmi ceux capables d'assurer une protection desdits fragments ou séquences nucléotidiques dans l'organisme et/ou leur pénétration dans les cellules de l'organisme.

Dans le cas de l'utilisation de fragments polyépitopiques et/ou de séquences peptidiques dérivées susmentionnées, de tels vecteurs sont choisis parmi les acides gras (dans le cadre de la préparation de lipopeptides), les liposomes etc.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet tout lipopeptide caractérisé en ce qu'il comprend:

- une partie peptidique comprenant un ou plusieurs fragments protéiques polyépitopiques choisis parmi ceux définis ci-dessus, ou toute séquence peptidique dérivée desdits fragments telle que définie ci-dessus,

- et une ou plusieurs parties lipophiles, avantageusement choisies parmi celles comprenant :

* une chaîne hydrocarbonée en C4 à C20, saturée ou insaturée, linéaire ou ramifiée,

* ou un groupe stéroïde, le cas échéant lié à la chaîne hydrocarbonée susmentionnée,

lesdites parties lipophiles étant éventuellement associées à un court peptide vecteur (pour former ainsi des motifs lipopeptidiques vecteurs) comportant une ou plusieurs fonctions ionisées à pH physiologique, et une fonction permettant la fixation covalente de ladite chaîne hydrocarbonée et/ou dudit groupe stéroïde.

Par partie lipophile, dans ce qui précède et ce qui suit, on entend toute molécule lipophile, insoluble dans l'eau, permettant, lorsqu'elle est liée à la partie peptidique définie ci-dessus, un passage intracellulaire passif du lipopeptide obtenu, grâce aux propriétés hydrophobes de ladite molécule. Avantageusement le lipopeptide résultant de la liaison de la partie lipophile à la partie peptidique, est soluble dans l'eau.

De préférence, la chaîne hydrocarbonée des parties lipophiles, est choisie parmi celles de :

- l'acide palmitique,
- l'acide oléique,
- l'acide linoléique,
- l'acide linolénique.

5 De préférence également, le groupe stéroïde de la ou des parties lipophiles, est choisi parmi les dérivés du cholestérol tel que l'acide cholest-5-ényl-3-oxy acétique, ou l'acide cholest-5-ényl-3-oxycarbonique.

10 L'invention a plus particulièrement pour objet tout lipopeptide tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que la ou les parties lipophiles sont liées de façon covalente à un ou plusieurs acides aminés de la partie peptidique.

15 Avantageusement, la ou les parties lipophiles sont liées de façon covalente à la fonction αNH_2 ou εNH_2 d'une lysine située en position N-terminale ou C-terminale de la partie peptidique, ou à la fonction thiol d'une cystéine, ou à toute fonction amino, alcool ou thiol éventuellement ajoutée au peptide avec un espaceur simple.

20 A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet tout lipopeptide tel que défini ci-dessus, dans lequel la ou les parties lipophiles sont représentées par un groupe $\text{N}^\alpha\text{-acetyl-Lysine N}^\varepsilon\text{(palmitoyl)}$ (encore désigné par l'abréviation Ac-K(Pam)).

La présente invention a également pour objet, des micelles ou micro-agrégats d'un ou plusieurs lipopeptides différents définis ci-dessus.

25 Avantageusement, lesdits micelles ou micro-agrégats ont une taille inférieure à environ 1 μm .

De préférence, les micelles ou micro-agrégats selon l'invention, sont tels qu'obtenus par dispersion desdits lipopeptides dans une solution d'acide acétique concentrée à environ 80%, ou tout autre solvant capable d'assurer une dispersion moléculaire des lipopeptides en solution.

Dans le cas de l'utilisation de séquences nucléotidiques définies ci-dessus selon l'invention, les vecteurs susmentionnés sont choisis parmi les virus, notamment les rétrovirus, les adénovirus et les virus associés (AAV Adeno Associated Virus).

30 L'invention a également pour objet les anticorps dirigés contre les fragments protéiques polyépitopiques ou les épitopes ou leurs séquences peptidiques dérivées (ou analogues) tels que définis ci-dessus, lesdits anticorps étant tels qu'obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un des complexes susmentionnés, lesdits

anticorps étant susceptibles de former un complexe avec ces fragments polyépitopiques ou ces épitopes ou leurs analogues.

Les anticorps selon l'invention sont des anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

Les anticorps polyclonaux susmentionnés sont obtenus par immunisation d'un animal avec au moins un fragment protéique polyépitopique ou un épitope ou un analogue selon l'invention, suivie de la récupération des anticorps recherchés sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixée un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment un fragment protéique polyépitopique ou un épitope ou un analogue selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être obtenus par la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec un fragment protéique polyépitopique ou un épitope ou un analogue selon l'invention, contre lesquels les lymphocytes B de l'animal sont alors capables de produire des anticorps. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (notamment murines) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clones, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis du fragment protéique polyépitopique ou épitope ou analogue de l'invention pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

L'invention concerne également l'utilisation d'un ou plusieurs anticorps susmentionnés pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* des pathologies susmentionnées.

A ce titre l'invention a également pour objet des trousse ou kits comprenant lesdits anticorps, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, ou vaccins, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

* a)

- au moins un fragment polyépitopique de la protéine E6 ou E7 tel que défini ci-dessus,

- et/ou au moins une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie ci-dessus,

- et/ou au moins un vecteur approprié, notamment des lipopeptides et/ou micelles définis ci-dessus, contenant au moins un fragment polyépitopique susmentionné de la protéine E6 ou E7, et/ou au moins une séquence dérivée susmentionnée de ces fragments,

en association avec un véhicule physiologiquement acceptable,

ledit fragment protéique polyépitopique et/ou sa séquence dérivée étant le cas échéant associés à un ou plusieurs autres épitopes exogènes reconnus par des cellules T auxiliaires (encore désignés épitopes CD4 ou T helper), lesdits épitopes étant choisis notamment parmi les suivants :

. le fragment peptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 830 et 846 de la séquence peptidique de la toxine tétanique, ledit fragment répondant à la formule suivante : QYIKANSKFIGITELKK,

. l'hémagglutinine (Prevost-Blondel et al., 1995, J. Virol., 62, n°12, pp 8046-8055),

. l'épitope PADRE (Alexander et al., 1994, Immunity, 1, 751).

* ou b)

- au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, codant pour un fragment polyépitopique susmentionné de la protéine E6 ou E7,

- et/ou au moins une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie ci-dessus,

les séquences nucléotidiques susmentionnées pouvant être utilisées nues, en tant que minigènes,

- et/ou au moins un vecteur approprié susmentionné, choisi notamment parmi les virus tels que définis ci-dessus, contenant au moins une séquence nucléotidique susmentionnée,

en association avec un véhicule physiologiquement acceptable,

* ou c)

- des anticorps définis ci-dessus, dirigés contre un fragment polyépitopique de la protéine E6 ou E7, et/ou contre une séquence peptidique dérivée de ces fragments, tels que définis ci-dessus, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

5 Avantageusement les compositions pharmaceutiques, ou vaccins, susmentionnés, se présentent sous une forme administrable par voie sous-cutanée, notamment à raison de plusieurs injections (avantageusement 3 injections) d'environ 500 µg du fragment polyépitopique sous forme lipopeptidique, à environ un mois d'intervalle.

10 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de fragments polyépitopiques de la protéine E6 ou E7 définis ci-dessus, ou de séquences peptidiques dérivées susmentionnées, ou de séquences nucléotidiques définies ci-dessus, ou d'anticorps susmentionnés, ou de lipopeptides définis ci-dessus, pour la préparation d'un médicament ou vaccin destiné à la prévention ou au traitement de pathologies liées à l'infection d'individus par les papillomavirus humains, telles que les néoplasies 15 cervicales intraépithéliales (CIN), le cancer invasif du col de l'utérus, les néoplasies vulvaires intraépithéliales (VIN).

L'invention concerne également les compositions pharmaceutiques, ou vaccins, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

* a)

20 - au moins un fragment polyépitopique de la protéine p53 tel que défini ci-dessus,
- et/ou au moins une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie ci-dessus,
- et/ou au moins un vecteur approprié, notamment des lipopeptides et/ou micelles définis ci-dessus, contenant au moins un fragment polyépitopique susmentionné de la protéine p53, et/ou au moins une séquence dérivée susmentionnée de ces fragments,
25 en association avec un véhicule physiologiquement acceptable,

30 ledit fragment protéique polyépitopique et/ou sa séquence dérivée étant le cas échéant associés à un ou plusieurs autres épitopes exogènes reconnus par des cellules T auxiliaires (encore désignés épitopes CD4 ou T helper), lesdits épitopes étant choisis notamment parmi ceux définis ci-dessus,

* ou b)

- au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, codant pour un fragment polyépitopique susmentionné de la protéine p53,

- et/ou au moins une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie ci-dessus,

les séquences nucléotidiques susmentionnées pouvant être utilisées nues, en tant que minigènes,

5 - et/ou au moins un vecteur approprié susmentionné, choisi notamment parmi les virus tels que définis ci-dessus, contenant au moins une séquence nucléotidique susmentionnée,

en association avec un véhicule physiologiquement acceptable,

* ou c)

10 - des anticorps définis ci-dessus, dirigés contre un fragment polyépitopique de la protéine p53, et/ou contre une séquence peptidique dérivée de ces fragments, tels que définis ci-dessus, en association avec un véhicule physiologiquement acceptable.

L'invention a également pour objet l'utilisation :

15 - d'au moins un fragment polyépitopique de la protéine p53, choisi parmi ceux définis ci-dessus,

- et/ou d'au moins une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie ci-dessus,

20 - ou d'au moins une séquence nucléotidique, telle que définie ci-dessus, codant pour un fragment polyépitopique de la protéine p53, et/ou pour une séquence peptidique dérivée de ce fragment, tels que définis ci-dessus,

pour la préparation d'un médicament ou vaccin destiné à la prévention ou au traitement des cancers, notamment les cancers du sein, du colon, du poumon, ou de la vessie.

25 L'invention concerne également les peptides ou épitopes de la protéine E6 d'HPV choisis parmi les suivants :

- (19)LPQLCTEL(26) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B51,

- (21)QLCTELQTTI(30) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,

- (24)TELQTTIHDI(33) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29 et B44,

- (33)IILECVYCK(41) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A11,

30 - (35)LECVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29 et B44,

- (37)CVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8,

- (46)RREVYDFAFR(55) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,

- (49)VYDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,

- (50)YDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,

- (52)FAFRDLCIV(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, B35, B51,
- (54)FRDLCIVYR(62) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (59)IVYRDGNPY(67) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (81)SEYRHHCY(88) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- 5 - (87)CYSLYGTTL(95) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (94)TLEQQYQNK(101) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (95)LEQQYQNKPL(103) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (101)KPLCDLLI(108) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, B35, B51,
- (118)CPEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8, B18, B35, B51,
- 10 - (119)PEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (127)DKKQRFHNI(135) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8,
- (128)KKQRFHNIR(136) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (130)QRFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (131)RFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24.

15 L'invention concerne également les peptides ou épitopes de la protéine E7 d'HPV choisis parmi les suivants :

- (3)GDTPTLHEY(11) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (5)TPTLHEYML(13) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (15)LQPETTDLY(23) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- 20 - (16)QPETTDLYCY(25) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, B18,
- (45)AEPDRAHY(52) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (46)EPDRAHYNIV(55) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, ou B35,
- (53)NIVTFCCCK(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (79)LEDLLMGTL(87) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- 25 - (89)IVCPICSQK(97) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11.

L'invention concerne également les séquences peptidiques dérivées des peptides susmentionnés, lesdites séquences dérivées, ou analogues, étant telles que définies ci-dessus dans le cadre des séquences dérivées des fragments protéiques polyépitopiques susmentionnés.

30 L'invention a également pour objet les séquences nucléotidiques codant pour les peptides des protéines E6 ou E7 susmentionnés, à savoir :

- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 43 et 66 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (15)RPRKLQL(22),

- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 52 et 78 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (18)KLPQLCTEL(26),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 55 et 78 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (19)LPQLCTEL(26),
- 5 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 61 et 90 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (21)QLCTELQTTI(30),
- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 70 et 99 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (24)TELQTTIHDI(33),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 97 et 123 de la 10 séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (33)IILECVYCK(41),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 103 et 132 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (35)LECVYCKQQL(44),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 109 et 132 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (37)CVYCKQQL(44),
- 15 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 136 et 165 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (46)RREVYDFAFR(55),
- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 145 et 171 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (49)VYDFAFRDL(57),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 148 et 171 de la 20 séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (50)YDFAFRDL(57),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 154 et 180 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (52)FAFRDLCIV(60),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 160 et 186 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (54)FRDLCIVYR(62),
- 25 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 175 et 201 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (59)IVYRDGNPY(67),
- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 241 et 264 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (81)SEYRHHCY(88),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 259 et 285 de la 30 séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (87)CYRLYGTTL(95),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 280 et 303 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (94)TLEQQYNK(101),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 283 et 309 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (95)LEQQYNKPL(103),

- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 301 et 324 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (101)KPLCDLLI(108),
- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 352 et 378 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (118)CPEEKQRHL(126),
 - 5 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 355 et 378 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (119)PEEKQRHL(126),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 379 et 405 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (127)DKKQRFHNI(135),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 382 et 408 de la 10 séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (128)KKQRFHNIR(136),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 388 et 417 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (130)QRFHNIRGRW(139),
 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 391 et 417 de la séquence SEQ ID NO : 1, codant pour (131)RFHNIRGRW(139),
- 15 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 7 et 33 de la séquence SEQ ID NO : 2, codant pour (3)GDTPTLHEY(11),
- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 13 et 39 de la séquence SEQ ID NO : 2, codant pour (5)TPTLHEYML(13),
- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 43 et 69 de la 20 séquence SEQ ID NO : 2, codant pour (15)LQPETTDLY(23),
- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 46 et 75 de la séquence SEQ ID NO : 2, codant pour (16)QPETTDLYCY(25),
- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 133 et 153 de la séquence SEQ ID NO : 2, codant pour (45)AEPDRAHY(52),
- 25 - la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 136 et 165 de la séquence SEQ ID NO : 2, codant pour (46)EPDRAHYNIV(55),
- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 157 et 180 de la séquence SEQ ID NO : 2, codant pour (53)NIVTFCCCK(60),
- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 235 et 261 de la 30 séquence SEQ ID NO : 2, codant pour (79)LEDLLMGTL(87),
- la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 265 et 291 de la séquence SEQ ID NO : 2, codant pour (89)IVCPICSQK(97).

L'invention a également pour objet les épitopes de la protéine p53 choisis parmi les suivants :

- (102)TYQGSYGFRL(111) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (105)GSYGFRLGFL(114) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (106)SYGFRLGFL(114) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (118)TAKSVTCTY(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- 5 - (125)TYSPALNKMF(134) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (152)PPGTRVRAM(160) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (155)TRVRAMAIYK(164) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (156)RVARAMAIY(163) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (162)IYKQSQHM(169) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- 10 - (195)IRVEGNLRVEY(205) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (197)VEGNLRVEY(205) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (201)LRVEYLDDR(209) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (203)VEYLDDRNTF(212) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (204)EYLLDDRNTF(212) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- 15 - (211)TFRHSVVV(218) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (212)FRHSVVVPY(220) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (227)SDCTTIHYNY(236) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (235)NYMCNSSCM(243) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (249)RPILTIITL(257) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- 20 - (257)LEDSSGNLL(265) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (263)NLLGRNSF(270) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (266)GRNSFEVR(273) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (272)VRVCACPGR(280) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27.

25 L'invention a également pour objet tout procédé de préparation de fragments polyépitopiques, d'épitopes simples (peptides susmentionnés), ou de séquences dérivées, par synthèse peptidique classique en phase liquide ou en phase solide.

En variante, les fragments polyépitopiques, épitopes simples, ou séquences peptidiques dérivées, tels que définis ci-dessus selon l'invention, peuvent être obtenus sous forme de polypeptides recombinants par transformation de cellules hôtes appropriées telles que définies ci-dessus à l'aide de vecteurs contenant une séquence nucléotidique recombinante telle que définie ci-dessus selon l'invention, et récupération, le cas échéant après purification, du polypeptide recombinant codé par ladite séquence nucléotidique et produit par les cellules hôtes susmentionnées.

REVENDICATIONS

1. Fragments polyépitopiques de la protéine E6 ou E7 de HPV caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence peptidique d'environ 15 à 30 acides aminés, cette séquence peptidique contenant les séquences en acides aminés d'au moins 3 épitopes différents se liant de façon stable à des molécules HLA de type identique ou différent, lorsque ces épitopes sont obtenus par dégradation enzymatique de ladite séquence peptidique, notamment dans le protéasome, de sorte qu'au moins 4 molécules HLA de différents types se lient à ces épitopes, ces 4 molécules HLA étant choisies parmi celles de type A1, A2, A3, A11, A24, A29, B7, B8, B18, B27, B35, B44, B51, et B62.

2. Fragments polyépitopiques selon la revendication 1, caractérisés en ce que le nombre d'acides aminés de leur séquence peptidique est supérieur ou égal à 17, et inférieur ou égal à 30.

3. Fragments polyépitopiques de la protéine E6 de HPV selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence peptidique d'environ 15 à 30 acides aminés, cette séquence peptidique contenant les séquences en acides aminés d'au moins 5 épitopes différents se liant de façon stable à des molécules HLA de type identique ou différent, lorsque ces épitopes sont obtenus par dégradation enzymatique de ladite séquence peptidique, notamment dans le protéasome, de sorte qu'au moins 6 molécules HLA de différents types se lient à ces épitopes, ces 6 molécules HLA étant choisies parmi celles de type A1, A2, A3, A11, A24, A29, B7, B8, B18, B27, B35, B44, et B51.

4. Fragments polyépitopiques de la protéine E6 de HPV selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisés en ce qu'ils comprennent tous un épitope se liant à la molécule HLA de type B35, un épitope se liant à la molécule HLA de type B44, et un épitope se liant à la molécule HLA de type B51.

5. Fragment polyépitopique de la protéine E6 de HPV selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 30 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 15 et 44 de la séquence peptidique de

la protéine E6 de HPV, et caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 4 suivante:

(15)RPRKLPQLCTELQTTIHDIIILECVYCKQQL(44)

ledit fragment contenant 9 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 8 molécules HLA de types suivants : A2, A11, A29, B7, B8, B35, B44, ou B51, lesdits épitopes étant les suivants :

- (15)RPRKLPQL(22) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, ou B35,
- (18)KLPQLCTEL(26) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (19)LPQLCTEL(26) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B51,
- 10 - (21)QLCTELQTTI(30) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (24)TELQTTIHD(33) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- (29)TIHDIIILRCV(38) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (33)IILECVYCK(41) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A11,
- (35)LECVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- 15 - (37)CVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8.

6. Fragment polyépitopique de la protéine E6 de HPV selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 17 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 46 et 62, ou au fragment de 22 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 46 et 67 de la séquence peptidique de la protéine E6 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 6 suivante :

(46)RREVYDFAFRDLCIVYRDGNPY(67)

ledit fragment contenant 6 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 10 molécules HLA de types suivants : A2, A3, A11, A24, A29, B7, B27, B35, B44, ou B51, lesdits épitopes étant les suivants :

- (46)RREVYDFAFR(55) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (49)VYDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (50)YDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- 30 - (52)FAFRDLCIV(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, B35, B51, ou B7,
- (54)FRDLCIVYR(62) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, ou A11,
- (59)IVYRDGNPY(67) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, ou A11.

7. Fragment polyépitopique de la protéine E6 de HPV selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 29 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 80 et 108 de la séquence peptidique de la protéine E6 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 8 suivante :

(80)ISEYRHYCYSLYGTTLLEQQYNKPLCDLLI(108)

ledit fragment contenant 6 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 10 molécules HLA de types suivants : A1, A3, A11, A24, A29, B7, B18, B35, B44, ou B51, lesdits épitopes étant les suivants :

- 10 - (80)ISEYRHYCY(88) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, ou B18,
- (81)SEYRHYCY(88) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- (87)CYSLYGTTL(95) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (94)TLEQQYNK(101) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, ou A11,
- (95)LEQQYNKPL(103) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou
- 15 B44,
- (101)KPLCDLLI(108) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, B35, ou B51.

8. Fragment polyépitopique de la protéine E6 de HPV selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 22 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 118 et 139 de la séquence peptidique de la protéine E6 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 10 suivante :

(118)CPEEKQRHLDKKQRFHNIRGRW(139)

ledit fragment contenant 6 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 7 molécules HLA de types suivants : A24, B8, B18, B27, B35, B44, ou B51, lesdits épitopes étant les suivants :

- 25 - (118)CPEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8, B18, B35, B51,
- (119)PEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- 30 - (127)DKKQRFHNI(135) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8,
- (128)KKQRFHNIR(136) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (130)QRFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (131)RFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24.

5

9. Fragments polyépitopiques de la protéine E7 de HPV selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence peptidique d'environ 15 à 30 acides aminés, cette séquence peptidique contenant les séquences en acides aminés d'au moins 3 épitopes différents se liant de façon stable à des molécules HLA de type identique ou différent, lorsque ces épitopes sont obtenus par dégradation enzymatique de ladite séquence peptidique, notamment dans le protéasome, de sorte qu'au moins 4 molécules HLA de différents types se lient à ces épitopes, ces 4 molécules HLA étant choisies parmi celles de type A1, A2, A3, A11, A29, B7, B18, B35, B44, et B62.

10

10 Fragments polyépitopiques de la protéine E7 de HPV selon la revendication 9, caractérisés en ce qu'ils comprennent tous un épitope se liant à la molécule HLA de type B44.

15

11. Fragment polyépitopique de la protéine E7 de HPV selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 23 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 3 et 25 de la séquence peptidique de la protéine E7 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 14 suivante :

(3)GDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCY(25)

20

ledit fragment contenant 5 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 6 molécules HLA de types suivants : A1, A2, B18, B35, B44, ou B62, lesdits épitopes étant les suivants :

25

- (3)GDTPTLHEY(11) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (5)TPTLHEYML(13) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- (11)YMLDLQPETT(20) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (15)LQPETTDLY(23) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (16)QPETTDLYCY(25) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, ou B18.

30

12. Fragment polyépitopique de la protéine E7 de HPV selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 17 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 44 et 60 de la séquence peptidique de la protéine E7 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 16 suivante :

(44)QAEVDRAHYNTVFCCK(60)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

ledit fragment contenant 4 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 6 molécules HLA de types suivants : A1, A3, A11, A29, B7, B18, B35, ou B44, lesdits épitopes étant les suivants :

- (44)QAEPDRAHY(52) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, ou B18,
- 5 - (45)AEPDRAHY(52) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- (46)EPDRAHYNTV(55) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, ou B35,
- (53)NIVTFCCK(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, ou A11.

10 13. Fragment polyépitopique de la protéine E7 de HPV selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce qu'il correspond au fragment de 19 acides aminés délimité par les acides aminés situés aux positions 79 et 97 de la séquence peptidique de la protéine E7 de HPV, ce dernier fragment étant caractérisé par la séquence peptidique SEQ ID NO : 18 suivante :

(79)LEDLLMGTLGIVCPICSQK(97)

15 ledit fragment contenant 4 épitopes se liant de façon stable à l'une au moins des 5 molécules HLA de types suivants : A2, A3, A11, A29, ou B44, lesdits épitopes étant les suivants :

- (79)LEDLLMGTL(87) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, ou B44,
- (82)LLMGTLGIV(90) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- 20 - (86)TLGIVCPI(93) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (89)IVCPICSQK(97) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, ou A11.

25 14. Fragments polyépitopiques de la protéine E6 ou E7 selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisés en ce qu'ils correspondent aux séquences peptidiques dérivées des fragments polyépitopiques définis dans l'une des revendications 1 à 13, notamment :

- par substitution, et/ou suppression, et/ou addition d'un ou plusieurs acides aminés, des fragments susmentionnés, et/ou
- par modification d'au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique des fragments susmentionnés, notamment par introduction d'une liaison du type rétro, ou rétro-inverso, et/ou
- 30 - par substitution d'au moins un acide aminé de la chaîne peptidique de la séquence ou du fragment susmentionnés, par un acide aminé non protéinogénique,

lesdites séquences dérivées contenant des peptides ou pseudopeptides se liant spécifiquement à la ou aux mêmes molécules du CMH que celles se liant aux peptides contenus dans les fragments polyépitopiques susmentionnés dont elles dérivent.

5 15. Séquences nucléotidiques codant pour un fragment polyépitopique ou pour une séquence peptidique dérivée selon l'une des revendications 1 à 14, lesdites séquences nucléotidiques étant issues de la séquence SEQ ID NO : 1 codant pour la protéine E6, ou de la séquence SEQ ID NO : 11 codant pour la protéine E7.

10 16. Séquences nucléotidiques selon la revendication 15, choisies parmi les suivantes:

- la séquence SEQ ID NO : 3, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 4 selon la revendication 5,
- la séquence SEQ ID NO : 5, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 6 selon la revendication 6;
- la séquence SEQ ID NO : 7, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 8 selon la revendication 7,
- la séquence SEQ ID NO : 9, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 10 selon la revendication 8,
- 15 - la séquence SEQ ID NO : 13, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 14 selon la revendication 11,
- la séquence SEQ ID NO : 15, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 16 selon la revendication 12,
- la séquence SEQ ID NO : 17, codant pour le fragment polyépitopique SEQ ID NO : 18 20 selon la revendication 13.

25 17. Anticorps, polyclonaux ou monoclonaux, dirigés contre un fragment polyépitopique ou contre une séquence peptidique dérivée selon l'une des revendications 1 à 14.

30

18. Lipopeptide caractérisé en ce qu'il comprend:

- une partie peptidique comprenant un ou plusieurs fragments protéiques polyépitopiques, ou une séquence peptidique dérivée desdits fragments, tels que définis dans l'une des revendications 1 à 14,

- et une ou plusieurs parties lipophiles, telles que celles comprenant :

* une chaîne hydrocarbonée en C4 à C20, saturée ou insaturée, linéaire ou ramifiée,

* ou un groupe stéroïde, le cas échéant lié à la chaîne hydrocarbonée susmentionnée,

lesdites parties lipophiles étant éventuellement associées à un court peptide vecteur comportant une ou plusieurs fonctions ionisées à pH physiologique, et une fonction permettant la fixation covalente de ladite chaîne hydrocarbonée et/ou dudit groupe stéroïde.

10

19. Composition pharmaceutique, ou vaccin, caractérisés en ce qu'ils comprennent :

* a)

- au moins un fragment polyépitopique de la protéine E6 ou E7 défini dans l'une des revendication 1 à 13,

- et/ou au moins une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie dans la revendication 14,

- et/ou au moins un vecteur approprié, notamment des lipopeptides selon la revendication 18 et/ou micelles, contenant au moins un fragment polyépitopique susmentionné de la protéine E6 ou E7, et/ou au moins une séquence dérivée susmentionnée de ces fragments,

en association avec un véhicule physiologiquement acceptable,

ledit fragment protéique polyépitopique et/ou sa séquence dérivée étant le cas échéant associés à un ou plusieurs autres épitopes exogènes reconnus par des cellules T auxiliaires, tels que le fragment peptidique délimité par les acides aminés situés aux positions 830 et 846 de la séquence peptidique de la toxine tétanique, l'hémagglutinine, ou l'épitope PADRE,

* ou b)

- au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 15 ou 16, codant pour un fragment polyépitopique susmentionné de la protéine E6 ou E7,

- et/ou au moins une séquence nucléotidique codant pour une séquence peptidique dérivée de ce fragment, telle que définie ci-dessus,

- et/ou au moins un vecteur approprié susmentionné, choisi notamment parmi les virus, contenant au moins une séquence nucléotidique susmentionnée,

en association avec un véhicule physiologiquement acceptable,

* ou c)

- des anticorps selon la revendication 17, dirigés contre un fragment polyépitopique de la protéine E6 ou E7, et/ou contre une séquence peptidique dérivée de ces fragments, tels que définis ci-dessus.

5

20. Utilisation de fragments polyépitopiques de la protéine E6 ou E7 définis dans l'une des revendications 1 à 13, ou de séquences peptidiques dérivées selon la revendication 14, ou de séquences nucléotidiques selon la revendication 15 ou 16, ou d'anticorps selon la revendication 17, ou de lipopeptides selon la revendication 18, pour la préparation d'un médicament ou vaccin destiné à la prévention ou au traitement de pathologies liées à l'infection d'individus par les papillomavirus humains, telles que les néoplasies cervicales intraépithéliales (CIN), le cancer invasif du col de l'utérus, les néoplasies vulvaires intraépithéliales (VIN).

10

15

21. Epitopes de la protéine E6 d'HPV choisis parmi les suivants :

20

- (19)LPQLCTEL(26) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B51,
- (21)QLCTELQTTI(30) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2,
- (24)TELQTTIHDI(33) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29 et B44,
- (33)IILECVYCK(41) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A11,
- (35)LECVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29 et B44,
- (37)CVYCKQQL(44) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8,
- (46)RREVYDFAFR(55) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (49)VYDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (50)YDFAFRDL(57) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44;
- (52)FAFRDLCIV(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A2, B35, B51,
- (54)FRDLCIVYR(62) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (59)IVYRDGNPY(67) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (81)SEYRHHCY(88) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (87)CYSLYGTTL(95) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24,
- (94)TLEQQYNK(101) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- (95)LEQQYNKPL(103) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (101)KPLCDLLI(108) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, B35, B51,
- (118)CPEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8, B18, B35, B51,

- (119)PEEKQRHL(126) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (127)DKKQRFHNI(135) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B8,
- (128)KKQRFHNIR(136) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- (130)QRFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B27,
- 5 - (131)RFHNIRGRW(139) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A24.

22. Epitopes de la protéine E7 d'HPV choisis parmi les suivants :

- (3)GDTPTLHEY(11) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B44,
- (5)PTPLHEYML(13) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B35,
- 10 - (15)LQPETTDLY(23) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B62,
- (16)QPETTDLYCY(25) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A1, B18,
- (45)AEPDRAHY(52) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (46)EPDRAHYNIV(55) se liant de façon stable aux molécules HLA de type B7, ou B35,
- (53)NIVTFCCCK(60) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11,
- 15 - (79)LEDLLMGTL(87) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A29, B44,
- (89)IVCPICSQK(97) se liant de façon stable aux molécules HLA de type A3, A11.

HPV16 protéine E6

A2

B7,B35,B51

A29,B44 — — — A11 — — —

— A2 — — — A2 — — —

— B51 — — — A2 — — —

— A2 — — — B8 — — —

— B7 ,B35 — — — A29,B44 — — — B27 — — —

MHQKRTAMFQDPQERPRKLPOQLCTELQTRIHDWLECVYCKQQLLRREVYDFA

44 46

15

A3,A11 — — — A24 — — — A1,A11 — — —

— A29,B44 — — — A29,D44 — — —

— B18 — — — B7,B35 — — —

— A1 — — — B51 — — —

FRDLCLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKISEYRHYCYSLYGTITLEQQYNKPLLCDL

67 80

B44 — — — B8 — — — A24 — — —

— B35,B51 — — — B27 — — —

— B18 — — — B27 — — —

— B8 — — — B27 — — —

LIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKKOREFHNRGRWTGRCMSSCRSSRTRRETQL

108 118 119

75

HPV16 protéine E7

Fig 2

LISTE DE SEQUENCES

<110> BIOVECTOR THERAPEUTICS
INSERM

5

<120> FRAGMENTS PROTEIQUES POLYEPITOPIQUES DE LA PROTEINE E6
OU E7 DE HPV, LEUR OBTENTION ET LEURS UTILISATIONS
NOTAMMENT EN VACCINATION

10 <130> WOB EPIT 2

<140>
<141>

15 <150> FR 9907012
<151> 1999-06-03

<160> 18

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 477

<212> ADN

25 <213> Papillomavirus humain

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(477)

30

<400> 1
atg cac caa aag aga act gca atg ttt cag gac cca cag gag cga ccc 48
Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
1 5 10 15

35

aga aag tta cca cag tta tgc aca gag ctg caa aca act ata cat gat 96
Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
20 25 30

40

ata ata tta gaa tgt gtg tac tgc aag caa cag tta ctg cga cgt gag 144
Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
35 40 45

45

gta tat gac ttt gct ttt cgg gat tta tgc ata gta tat aga gat ggg 192
Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
50 55 60

50

aat cca tat gct gta tgt gat aaa tgt tta aag ttt tat tct aaa att 240
Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
65 70 75 80

55

agt gag tat aga cat tat tgt tat agt ttg tat gga aca aca tta gaa 288
Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
85 90 95

60

tgt caa aag cca ctg tgt cct gaa gaa aag caa aga cat ctg gac aaa 384
 Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
 115 120 125
 5
 aag caa aga ttc cat aat ata agg ggt cgg tgg acc ggt cga tgt atg 432
 Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
 130 135 140
 10 tct tgt tgc aga tca tca aga aca cgt aga gaa acc cag ctg tga 477
 Ser Cys Cys Arg Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 145 150 155
 15 <210> 2
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Papillomavirus humain
 20 <400> 2
 Met His Gln Lys Arg Thr Ala Met Phe Gln Asp Pro Gln Glu Arg Pro
 1 5 10 15
 Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp
 25 20 25 30
 Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu
 35 40 45
 30 Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly
 50 55 60
 Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile
 65 70 75 80
 35 Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu
 85 90 95
 Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn
 40 100 105 110
 Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys
 115 120 125
 45 Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
 130 135 140
 Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 145 150 155
 50
 <210> 3
 <211> 90
 55 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 60 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 de la séquence codant pour E6 de HPV et séquence
 peptidique correspondante

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(90)
 5
 <400> 3
 cga ccc aga aag tta cca cag tta tgc aca gag ctg caa aca act ata 48
 Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile
 1 5 10 15
 10 cat gat ata ata tta gaa tgt gtg tac tgc aag caa cag tta 90
 His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu
 20 25 30
 15
 <210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 20 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 de la séquence codant pour E6 de HPV et séquence
 peptidique correspondante
 <400> 4
 25 Arg Pro Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile
 1 5 10 15
 His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu
 20 25 30
 30
 <210> 5
 <211> 66
 35 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle
 <220>
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
 40 de la séquence codant pour E6 de HPV et séquence
 peptidique correspondante
 <220>
 <221> CDS
 45 <222> (1)...(66)
 <400> 5
 cga cgt gag gta tat gac ttt gct ttt cgg gat tta tgc ata gta tat 48
 Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr
 50 1 5 10 15
 aga gat ggg aat cca tat 66
 Arg Asp Gly Asn Pro Tyr
 20
 55
 <210> 6
 <211> 22
 <212> PRT
 60 <213> Séquence artificielle
 <223> Description de la séquence artificielle: fragment

de la séquence codant pour E6 de HPV et séquence
peptidique correspondante

<400> 6
5 Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu Cys Ile Val Tyr
1 5 10 15
Arg Asp Gly Asn Pro Tyr
20
10
<210> 7
<211> 87
<212> ADN
15 <213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: fragment
de la séquence codant pour E6 de HPV et séquence
20 peptidique correspondante

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(87)
25
<400> 7
att agt gag tat aga cat tat tgt tat agt ttg tat gga aca aca tta 48
Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu
1 5 10 15
30 gaa cag caa tac aac aaa ccg ttg tgt gat ttg tta att 87
Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile
20 25
35
<210> 8
<211> 29
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
40 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
de la séquence codant pour E6 de HPV et séquence
peptidique correspondante

<400> 8
45 Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr Gly Thr Thr Leu
1 5 10 15
Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu Ile
20 25
50

<210> 9
<211> 66
55 <212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: fragment
de la séquence codant pour E6 de HPV et séquence
60 peptidique correspondante

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(66)

5

<400> 9
tgt cct gaa gaa aag caa aga cat ctg gac aaa aag caa aga ttc cat 48
Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His
1 5 10 15

10

aat ata agg ggt cgg tgg 66
Asn Ile Arg Gly Arg Trp
20

15

<210> 10

<211> 22

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

20 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
de la séquence codant pour E6 de HPV et séquence
peptidique correspondante

<400> 10

25 Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His Leu Asp Lys Lys Gln Arg Phe His
1 5 10 15

Asn Ile Arg Gly Arg Trp
20

30

<210> 11

<211> 297

35 <212> ADN

<213> Papillomavirus humain

<220>

<221> CDS

40 <222> (1)..(297)

<400> 11

45 atg cat gga gat aca cct aca ttg cat gaa tat atg tta gat ttg caa 48
Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

cca gag aca act gat ctc tac tgt tat gag caa tta aat gac agc tca 96
Pro Glu Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
20 25 30

50

gag gag gag gat gaa ata gat ggt cca gct gga caa gca gaa ccg gac 144
Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp
35 40 45

55

aga gcc cat tac aat att gta acc ttt tgt tgc aag tgt gac tct acg 192
Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60

60

ctt cgg ttg tgc gta caa agc aca cac gta gac att cgt act ttg gaa 240
Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

<210> 14
<211> 23
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
5 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
de la séquence codant pour E7 de HPV et séquence
peptidique correspondante

<400> 14
10 Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu
1 5 10 15

Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr
20

15

<210> 15
<211> 51
20 <212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: fragment
25 de la séquence codant pour E7 de HPV et séquence
peptidique correspondante

<220>
<221> CDS
30 <222> (1)...(51)

<400> 15
caa gca gaa ccg gac aga gcc cat tac aat att gta acc ttt tgt tgc 48
Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
35 1 5 10 15

aag
Lys 51

40

<210> 16
<211> 17
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
45 <223> Description de la séquence artificielle: fragment
de la séquence codant pour E7 de HPV et séquence
peptidique correspondante

<400> 16
50 Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
1 5 10 15

Lys.

55

<210> 17
<211> 57
60 <212> ADN
<213> Séquence artificielle

5 <220>
<223> Description de la séquence artificielle: fragment
de la séquence codant pour E7 de HPV et séquence
peptidique correspondante

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(57)

15 <400> 17
ttg gaa gac ctg tta atg ggc aca cta gga att gtg tgc ccc atc tgt
Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys
1 5 10 15 48

15 tct cag aaa
Ser Gln Lys 57

20 <210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<223> Description de la séquence artificielle: fragment
25 de la séquence codant pour E7 de HPV et séquence
peptidique correspondante

30 <400> 18
Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys
1 5 10 15

Ser Gln Lys

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)